

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-149790

(43) 公開日 平成9年(1997)6月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
5/10			9/52	

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-212196

(22) 出願日 平成8年(1996)7月24日

(31) 優先権主張番号 特願平7-275105

(32) 優先日 平7(1995)9月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72) 発明者 鶴岡 伸夫

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72) 発明者 山城 恭子

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72) 発明者 辻本 雅文

埼玉県朝霞市三原町1丁目11番12号 ガーデンコート志木311

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ

(57) 【要約】

【課題】 新規なアミノ酸配列の提供。

【解決手段】 配列番号: 3 に示すアミノ酸番号 1 ~ 2
23 のアミノ酸配列を有するセリンプロテアーゼ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：3に示すアミノ酸番号1から223までのアミノ酸配列（但し、アミノ酸番号1のロイシンは欠失していてもよい）、配列番号：4に示すアミノ酸番号1から233までのアミノ酸配列もしくは配列番号：5に示すアミノ酸番号1から241までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

【請求項2】 配列番号：3に示すアミノ酸番号1から223までのアミノ酸配列（但し、アミノ酸番号1のロイシンは欠失していてもよい）、配列番号：4に示すアミノ酸番号1から233までのアミノ酸配列もしくは配列番号：5に示すアミノ酸番号1から241までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列番号：3のヌクレオチド番号219～887、同222～887、配列番号：4のヌクレオチド番号1～699もしくは配列番号：5のヌクレオチド番号1～723のヌクレオチド配列またはその部分ヌクレオチド配列を含んで成る、請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 請求項2又は3に記載のDNAを含んで成る組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主。

【請求項6】 請求項1に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドの製造方法において、請求項5に記載の宿主を培養し、培養物から前記セリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを採取することを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項1に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼを用いる阻害物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっていく（Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984）。また、高等動物におけるセリンプロテアーゼは、その活性中心の一次構造から、キモトリプシン族およびサブチリシン族に大別される。キモトリプシン族においては、その活性発現のために、活性中心のセリン残基のほかにはヒ

スチジン残基が必須であり、また、セリン残基やヒスチジン残基の近傍のアミノ酸配列がよく保存されていることが知られている。

【0003】従って、これら保存された領域を使ってPCR法によりセリンプロテアーゼ遺伝子をクローニングする試みもなされている。すなわち、PCRプライマーとして、セリンプロテアーゼにおいてよく保存されているヒスチジン残基近傍のアラニン-アラニン-ヒスチジン-システイン（AAHC）ならびにセリン残基近傍のアスパラギン酸-セリン-グリシン-グリシン-プロリン（DSGGP）を用いて、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離したことが報告されている。

【0004】例えば、Sakanariらは、線虫および原虫からラットトリプシンIIと67%の類似性をもつセリンプロテアーゼ遺伝子を単離した（Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S. and McKerron, J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4863-4867, 1989）。また、Mueller-Hillのグループは、ラット脾臓からラットトリプシンVおよびラットエラスターゼIVを単離し（Kang, J., Wiegand, U. and Mueller-Hill, B., Gene, 110, 181-187, 1992）。また、同じグループで、ヒト脳よりヒトトリプシンIVを単離した（Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Mueller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993）。

【0005】しかしながら、これら先行文献においては、線虫や原虫ならびに脾臓や脳の組織由来のcDNAをもとに単離されている。また、このようなPCRプライマーを用いて単離されたセリンプロテアーゼ遺伝子は、サイモゲンとして存在するため、セリンプロテアーゼ活性を持つタンパク質をコードする遺伝子であるかどうかの確認まで至っていないのが現状である。さらに、線虫や原虫ならびに臓器ばかりでなく、培養により増殖させることが可能な各種株化癌細胞のcDNAを使うことができれば、セリンプロテアーゼ遺伝子の単離がより容易になることは想像に難くないが、血清添加した培養細胞の上清ではセリンプロテアーゼ活性を測定することができないのが実状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼ遺伝子を提供することにある。さらに、本発明は当該遺伝子を用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離するための出発材料として、ヒト結腸癌COLO 201細胞に着目した。すなわち、本発明者らは、COLO 201細胞を無タンパク質培地で培養

した培養上清中にセリンプロテアーゼ酵素活性を認め、このような新規セリンプロテアーゼ遺伝子の単離のためには、COLO 201細胞のような癌細胞から調製したcDNAを用いることが有効であることを発見した。かつ、単離した遺伝子が真に酵素活性をコードする遺伝子であるかどうかを確認するために、成熟タンパク質として発現することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0008】

【発明の実施の形態】ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞(ATCC CCL-224)は、動物細胞の培養に常用されている任意の方法により培養することができる。かつ、タンパク質を全く含まない培地を用いて静置培養することも可能である。具体例を実施例1に記載する。

【0009】培養上清中の酵素活性測定法は、市販の合成基質に7-アミノ-4-メチルクマリンやp-ニトロアニリドなどを結合させたものを用いて、容易に測定することができる。具体例を実施例2に記載する。この結果、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞の培養上清中には、明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性を認めた。そこで、本酵素活性を含め、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞に発現しているすべてのセリンプロテアーゼ遺伝子を単離することを目的として、以下の実験を行った。すなわち、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞からmRNAを単離精製し、cDNAライブラリーを作製した。作製したcDNAライブラリーからセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインしたPCRプライマーを用いてPCRによるスクリーニングを行い、得られたPCR産物をサブクローニングした。

【0010】その結果、活性残基であるセリンおよびヒスチジン間にもセリンプロテアーゼに保存されているアミノ酸をコードする塩基配列を含むクローニングが確認された。こうして得られた遺伝子をプローブとして、常法により全長の遺伝子をクローニングした結果、SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子を単離し、新規セリンプロテアーゼを確認することが出来た。具体例を実施例3に記載する。

【0011】以上の結果、本発明者らは、ヒト結腸癌由来COLO 201細胞のcDNAから、既知のセリンプロテアーゼと類似性が30%未満である新規セリンプロテアーゼ遺伝子(SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子)の単離に成功した。また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子をプローブとして、ヒト臓器でのmRNAの発現を確認したところ、SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子ともヒト臓器での発現が認められ、SP59遺伝子は特に脳において強い発現を認め、約1.4kbの大きさであった。具体例を実施例4に記載する。このことから、単離された新規セリンプロテアーゼ遺伝子は、ヒト臓器でも発現していることが確認された。

【0012】また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子の構造から、成熟タンパク質として動物細胞で発現する方法を考案した。すなわち、代表的なセリンプロテ

アーゼであるトリプシンは、プロ体であるトリプシノーゲンとして発現した後、十二指腸粘膜に分布する酵素エンテロキナーゼの作用によりイソロイシンをN末端アミノ酸とする成熟活性タンパク質として存在することが知られている。

【0013】そこで、SP59遺伝子の成熟タンパク質をコードすると考えられる遺伝子の前にトリプシン遺伝子のシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を繋いだキメラ遺伝子(Trp59遺伝子)を作製した。作製したキメラ遺伝子であるTrp59遺伝子をCOS-1細胞にトランスフェクションした後、COS-1細胞の培養上清にエンテロキナーゼを作用させた結果、セリンプロテアーゼ酵素活性を確認した。具体的手法を実施例5に記載する。

【0014】以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなったばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列として配列番号：3、4および5に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子はこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0015】本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子を得るには、実施例3に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子は、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0016】ゲノムからクローニングする場合、実施例3において使用した種々のプライマースクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、配列番号：3、4または5に記載するヌクレオチド配列に基づいて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている(Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章)。

【0017】本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子はまた、化学合成によっても調製することが

できる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396 DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、配列番号：3、4および5に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

【0018】本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードする遺伝子は、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また配列番号：3、4または5に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法(site-directed mutagenesis)等常法に従って得ることもできる(例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第8章を参照のこと)。

【0019】上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼをコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物(細胞又は培地)から目的とするセリンプロテアーゼを採取する。本発明のセリンプロテアーゼは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などのC₁、アシル化または欠失等がされた形で得られてもよい。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼの構造遺伝子の5'側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例示としては、実施例5に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

【0020】宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌(*Escherichia coli*)、バシルス属(*Bacillus*)細菌、例えばバシルス・ズブチリス(*B. subtilis*)等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*S. cerevisiae*)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞(*Spodoptera frugiperda*)、キャベツルーバー細胞(*Trichoplusia ni*)、カイコ細胞(*Bombyx mori*)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1細胞、Vero細胞、CHO細胞、L細胞、ミエロー

マ細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞、Sp-2/O細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーバー等を用いることもできる。

【0021】発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス(バキュロ(昆虫)、ワクチニア(動物細胞))等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしてはlacプロモーター、trpプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、adh1プロモーター、pkkプロモーター等が使用される。また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus40のearlyもしくはlateプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターまたはSRαプロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー(例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(メトトレキセート耐性)、neo遺伝子(G418耐性)等)等を含むものを用いるのが好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えばSV40のエンハンサー等を遺伝子の上流または下流に挿入する。

【0022】発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0023】このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼは、機能的タンパク質であることから、本酵素を用いる本酵素特異的阻害物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の本酵素阻害活性を、実施例2と同様にして、酵素活性の測定を行なうことにより行うことができる。また、本発明のセリンプロテアーゼの部分ペプチドまたは前記した本酵素の遺伝子もしくはその部分ペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記酵素活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

【0024】すなわち、本発明のセリンプロテアーゼは、その部分ペプチドとして本発明のスクリーニング方法に用いることができる。また、本発明のスクリーニング方法においては、本発明のセリンプロテアーゼをコードする遺伝子またはその部分ペプチドをコードするDNAを含んで成る組換えベクターにより形質転換され、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを発現する宿主細胞またはその細胞膜画分を使用してもよい。

【0025】この場合の部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および例えば実施例3(6)に用いたような本発明のセリンプロテアーゼに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行なうことができる。

【0026】また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

【0027】本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドまたは該セリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる酵素活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。なお、セリンプロテアーゼを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化(グルタルアル

デヒド、ホルムアルデヒド等で)して用いることができる。

【0028】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

実施例1. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養と培養上清の調製

ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞(ATCC CCL-224)を80 cm²の培養面積を持つTフラスコ(Nunc)で培養した。すなわち、Tフラスコあたり2×10⁶細胞を植え、10%ウシ胎児血清(FBS, GIBCO BRL社)を含むRPMI-1640培地(日本製薬)を用いて、コンフルエントになるまで培養した。次に、10⁻⁸M 亜セレン酸ナトリウム(Sigma)含有タンパク質無添加 RPMI-1640培地に交換した。2週間培養後、培養上清を回収し、0.22μmの滅菌フィルター(Millipore)で濾過滅菌した後、培養上清中の酵素活性を測定する材料に供した。

【0029】実施例2. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養上清中の酵素活性の測定

実施例1で得られた培養上清中のセリンプロテアーゼ酵素活性は、テストチーム発色基質S-2251(H-D-バリル-L-ロイシル-L-リジル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩、第一化学薬品)を用いて測定した。すなわち、精製水で1 mg/mlに溶解したテストチーム発色基質S-2251 50 μl、0.1 M Tris/HCl (pH7.5) 40 μl および COLO 201 細胞の培養上清10 μlを加え、室温で60分放置後、405 nmにおける吸光度を測定した。

【0030】培養上清の代わりに培地を10 μl加えた時の吸光度をブランクとした場合、COLO 201細胞の培養上清の吸光度は、0.42であった。また、別の基質H-D-バリル-L-ロイシル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩(第一化学薬品)を用いても同程度の活性を示した。また、本測定系における各種プロテアーゼ阻害剤の効果をみた結果、COLO 201細胞の培養上清中には明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性があることが確認された(表1)。

【0031】

【表1】

阻害剤* 又は処理		残存活性 (%)
アプロチニン	250 KIU/ml	0.4%
ロイペプチン	0.1 mM	0.7%
ベンズアミジン	1 mM	0.7%
pABSF ¹⁾	1 mM	1.4%
NEM ²⁾	1 mM	100.0%
EDTA ³⁾	1 mM	74.0%
トリトン	2.5%	61.1%
	0.25%	100.0%
SDS ⁴⁾	0.2%	0.0%
加熱	95℃、10分間	27.0%

*ブレインキュベーション37℃、10分間

1) pABSF: 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホン

フルオリド・HCl (和光純薬)

2) NEM: N-エチルマレイミド (Sigma)

3) EDTA: エチレンジアミン四酢酸 (Sigma)

4) SDS: ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma)

【0032】実施例3. 新規セリンプロテアーゼ遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

(1) COLO 201細胞 mRNA の単離精製

COLO 201細胞 mRNA の調製は、アイソジェン (日本ゼイン) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、COLO 201細胞をTフラスコ(Nunc, 80cm²)でコンフルエントになるまで増殖させた後、Tフラスコあたり1 mlのアイソジェンを加えることにより細胞を溶解した。さらに、クロロホルム200 μ lを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4℃で15分間遠心した。

【0033】遠心後、水相を回収し、回収した水相に500 μ lのイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4℃で30分間遠心した。得られた全RNAの沈殿を400 μ lのジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水に溶解し、400 μ lの2×溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl pH7.5, 2mM EDTA, 0.2% SDS)を加え混合した。さらに、500 μ lのOligotex-dT30(日本ロッシュ)懸濁液を加えて混合し、65℃で5分間加熱した。水中で急冷後、130 μ lの5M NaClを加えて37℃で10分間加温した。

【0034】加温後、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上清を取り除いた後、沈殿を500 μ lの洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1M NaCl)に懸濁し、さらに、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心した。上清を取り除いた後、沈殿を400 μ lのDEPC処理

した蒸留水に懸濁した。65℃で5分間加熱した後、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上清を回収した。

【0035】この上清に20 μ lの5M NaCl、1 mlのエタノールを加え、攪拌後、15,000 rpm, 4℃で20分間遠心した。沈殿物を500 μ lの70%エタノールで洗い、軽く風乾後、10 μ lのDEPC処理した蒸留水に溶解した。この結果、Tフラスコ16本から約12 μ gのpolyA⁺ RNAを得た。

(2) cDNAライブラリーの調製

cDNAライブラリーの調製は、スーパー・スクリプト・プラスミド・システム (Super Script Plasmid System) (Life Technologies) を用いて行った。

【0036】工程1. cDNAの合成

COLO 201細胞 mRNA 5 μ l (約6 μ g) にオリゴdT_{Not}Iプライマー 2 μ l (1 μ g)を加え、70℃で10分間熱した後、水中で急冷した。この熱変性mRNAに、4 μ lの5×First strand buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂)、1 μ lの10mM dNTP、2 μ lの0.1M DTT、DEPC処理した蒸留水および5 μ l (1000U)のSuper Script II RTを加え、37℃で1時間反応させた。

【0037】次に、この反応液に91 μ lのDEPC処理した蒸留水、30 μ lの5×Second strand buffer (100mM Tris-HCl pH6.9, 450mM KCl, 23mM MgCl₂, 0.75mM β -NAD⁺, 50mM (NH₄)₂SO₄)、3 μ lの10mM dNTP、1 μ l (10U)

のE.Coli DNAリガーゼ、4 μ l (40U) のE.Coli DNA polymerase および 1 μ l (20) のE.Coli RNase Hを加え、16℃で2時間反応後、2 μ l (10U) のT4 DNAポリメラーゼを加え16℃で5分間反応させた。

【0038】さらに、この溶液に10 μ l の0.5M EDTAを加えて混合した後、150 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000rpmで5分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 μ l の5M KOAc、400 μ l のエタノールを加え攪拌し、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を500 μ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後、25 μ l のDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0039】工程2. Sal I アダプターの付加
工程1で得られた2本鎖cDNA 25 μ l に10 μ l の5 \times T4 DNA リガーゼ緩衝液(25mM Tris-HCl pH7.6, 50mM MgCl₂, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% (w/v), PEG 8000), Sal I アダプター溶液10 μ l (10 μ g) および 5 μ l (5U) のT4 DNAリガーゼを加え、16℃にて16時間反応後、50 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000 rpmで5分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5 μ l の5M KOAc、125 μ l のエタノールを加え攪拌し、-80℃、30分間冷却後、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200 μ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後、40 μ l のDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0040】工程3. 制限酵素Not I による切断
工程2の反応液20 μ l にNot I 4 μ l (60U)を加え、37℃で3時間反応後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を行い、上清を回収した。この上清をクロマスピニン-1000 カラム(クローテック)で1キロボルト以上のサイズを分画し50 μ l の溶出液を得た。

【0041】工程4. pSPORTベクターとのライゲーション
サイズ分画したcDNA溶液 3 μ l にSal I およびNot I で消化したpSPORTベクター1 μ l (50ng; Life Technologies)を加え、さらに11 μ l のDEPC処理した蒸留水、4 μ l の5 \times T4 DNAリガーゼ緩衝液および1 μ l の5 \times T4 DNAリガーゼを加え、室温で3時間反応させた。

【0042】反応後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を行い、5 μ l (5 μ g) の酵母tRNA、5 μ l の5M KOAc および 125 μ l のエタノールを加えて攪拌し、-80℃で20分間冷却後、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200 μ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後 5 μ l のTE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解した。

【0043】工程5. 大腸菌DH10Bへの形質転換
工程4で得られたライゲーション後cDNAを大腸菌Electro MAX DH10B(F⁻, mcrA, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (mrr-hsdR^MS-mcrBC), Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ

(ara, leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG; Life Technologies)にエレクトロポレーション法により形質転換した。すなわち、50 μ l のDH10B細胞に2 μ l のライゲーション後cDNAを加え、終容量26 μ l \times 2本として、エレクトロポレーター(Bio-Rad)で400V, 330 μ Fの条件で実施した。

【0044】次に、4ml のSOC 培地(2%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, 20mM グルコース)で大腸菌を回収し、37℃で1時間振とう培養後、50 mg/ml のアンピシリンを含むLBプレート(1%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 0.5% NaCl, 0.1% グルコース, 1.5%バクト・アガー)にまいて37℃で一晩培養した。その結果、約1.1 \times 10⁶個のクローンを含むcDNAライブラリーが得られた。

【0045】(3) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

活性残基(His)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号: 1に示すオリゴマーKY185を合成した。また、活性残基(Ser)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号: 2に示すオリゴマーKY189を合成した。実施例3(2)工程3. で得られたcDNAをテンプレート、オリゴマーKY185-KY189をプライマーとして、Ampli-Taqポリメラーゼ(パーキンエルマー社)にてPCRを行った。このPCR反応液をpCR IIベクター(インビトロジェン)にサブクローニングし、431塩基対のDNA断片を持つクローンを得た。これらクローンのシーケンスを行った結果、2つの活性残基(His, Ser)の間にあるセリンプロテアーゼに保存されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが確認された。

【0046】(4) セリンプロテアーゼのスクリーニング

前記実施例3.(3)で得られたプラスミドをテンプレートとしたPCRにより、蛍光標識プローブを作成した。このプローブを用い、実施例3(2)工程5. で得られた約110万クローンのcDNAライブラリーを常法によりスクリーニングした。その結果、約20万個から6個の陽性クローンを得た。挿入DNA断片の大きさを調べ、最長のクローンpSPORT / SP59-#3(約1.4キロボルト)を選び、本遺伝子のシーケンスをTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)で決定した。

【0047】(5) 塩基配列の特徴

pSPORT / SP59-#3のcDNAの塩基配列を配列番号: 3に示す。その結果、pSPORT / SP59-#3のcDNAの全長は1,438塩基対で、155塩基対の5'非翻訳領域、732塩基対の翻訳領域、551塩基対の3'非翻訳領域から成る。翻訳領域はアミノ酸244残基をコードしていることが明らかとなった。

【0048】(6) SP59タンパク質のペプチドフラグメント

ントに対する抗体の作製

SP59のアミノ酸配列のうち、配列番号：6の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号56～67にCysを付加したもの）、配列番号：7の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号96～110番）および配列番号：8の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号210～223番）を合成して、純度90%以上の各部分ペプチドを得た。

【0049】各ペプチドフラグメントは、N-(α -マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド（MBS、ナカライテスク）で活性化したウシ血清アルブミン（BSA、ナカライテスク）に結合させて免疫した。すなわち、5mgのBSAを50mMリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解した後、DMSOに溶解したMBSを1.25mg加え、室温で30分間攪拌し、MBS活性化BSAを得た。次に、MBS活性化BSAに50mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した各ペプチドフラグメント5mgを加え、室温で3時間攪拌することによりカップリングした。カップリングした各ペプチドフラグメントをFreund完全アジュバント（ナカライテスク）と混和し、常法により抗血清を作製した。

【0050】（7）ヒト肝臓癌由来のHPC-Y3細胞培養上清からのSP59タンパク質の精製

実施例1と同様にして得られたHPC-Y3細胞培養上清の凍結乾燥品10mgを0.1 M NaClを含む10mM Tris-HCl、pH 7.4に1mg/mlによるように溶解し、4 ml/分の流速でSuperose 6（ファルマシア）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。各フラクションを（6）で得たSP59部分ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットおよび合成基質（Boc-Phe-Ser-Arg-4-メチル-L-グルタミンアミド（以下、MCA）、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA）を用いた酵素活性の測定を実施した。その結果、フラクション63-70に溶出した画分に活性を認め、同画分をMono Qカラム（ファルマシア）によるイオン交換クロマトグラフィーにそのままアプライした。

【0051】次に、Mono Qカラム非結合画分をそのまま10mMリン酸緩衝液、pH6.8であらかじめ平衡化したヒトロキシアパタイトカラム（ペンタックス）にアプライしたのち、リン酸緩衝液のリニアグラジエントで溶出させたところ、活性画分は、150 mM濃度のリン酸緩衝液で溶出した。ついで、20mMリン酸緩衝液、pH6.8であらかじめ平衡化したMono Sカラムにアプライし、0.1 M NaCl濃度でシングルピークとして活性画分が溶出した。溶出画分をC4カラムで脱塩したのち、N末端アミノ酸分析に供した。

【0052】（8）N末端アミノ酸配列の分析

SP59タンパク質のN末端アミノ酸配列分析を、以下の通り行った。すなわち、HPC-Y3細胞無タンパク質培養上清から、前述した方法で精製したSP59タンパク質を用いて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行なった。電気泳動後、Matsudaira (Matsudaira, P. (1987) J. Biol. Chem. 262, 10035-10038)の方法に従ってPVD F膜に転写

した。さらに、Speicher (Speicher, D. W. (1989) "Techniques in Protein Chemistry" (Hugli, T. E. ed.), pp. 24-35. Academic Press, San Diego)の方法に従ってクーマシーブルー染色することによりSP59タンパク質を検出した。このSP59タンパク質染色画分を切り取り、十分に洗浄、風乾後、N末端アミノ酸配列分析の試料とした。分析には、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) の477 A気相シーケンサーを用いた。

【0053】フェニルチオヒダントイン誘導体は、アプライド・バイオシステムズの120 Aオンラインシステムの逆相HPLC (Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., & Dreyer, W. J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7990-7997)によって同定した。その結果、SP59タンパク質の成熟型N末端アミノ酸配列は、推定された通り、アミノ酸配列 (LVHG) であることを確認した。また、成熟型SP59タンパク質のN末端アミノ酸ロイシンが1つ欠失したアミノ酸配列 (VHG) も同時に存在することが明らかとなった。

【0054】（9）SP60およびSP67の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

01L0201細胞から、前述した方法と同様にしてSP60およびSP67の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定を行ない、セリンプロテアーゼに特有の触媒三つ組残基 (catalytic triad) を有するSP60（配列番号：4）およびSP67（配列番号：5）を得た。これらのDNAは、SP59と同様にして発現せしめ、セリンプロテアーゼを得ることができる。

【0055】実施例4. SP59遺伝子のNorthernブロットによるヒト臓器での発現

pSPORT / SP59-#3を制限酵素Mlu I で消化し、約1.4 キロ塩基対のDNA断片を単離・精製し、 α -³²P dCTP (Amersham) で標識し、プローブとした。このプローブと16種の臓器から調製したmRNAをブロッティングしたメンブランフィルター（クローンテック）を65℃で2時間反応させた。

【0056】次に、このメンブランフィルターを0.1% SDSを含む2×SSC (150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム) で室温、20分間、続いて、1×SSC, 0.1% SDS に替え65℃、30分間で2回洗い、BAS2000用イメージングプレート（富士写真フィルム）に30分間露光させ、解析した。その結果を図1に示した。SP59遺伝子のヒト臓器でのmRNAの発現は、特に脳において強い発現を認め、約1.4 kbの大きさであった。また、SP60遺伝子およびSP67遺伝子について、SP59遺伝子と同様に試験を行った結果、それぞれ結腸、前立腺、小腸および腎、並びに結腸、小腸、前立腺および脾臓に強い発現を認めた。

【0057】実施例5. SP59遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

（1）発現プラスミドの構築

pSPORT / SP59-#3をMlu I で消化後、約1.4 キロ塩基対

のDNA断片を単離・精製し、TEに溶解した。同様に、SV40プロモーターをもつpdkCRベクター(Nikaido, T.ら、Nature, 311, 631-635(1984):pdkCRベクターのpBR322部分にpBR322に置換したベクター)もMlu Iにて消化後、アルカリホスファターゼにより脱リン酸化し、フェノール:クロロホルム:イソamilアルコール(25:24:1)抽出を行い、エタノール沈殿しTEに溶解した。

【0058】常法に従い、pSPORT / SP59-#3のDNA断片とpdkCRベクターDNA断片をライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼSP59発現プラスミドpdkCR / SP59を得た。次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI、3'側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。KY239およびKY240を、配列番号:9および10に示す。

【0059】これらプライマーKY239およびKY240を用い、pCR II/Trypsin II プラスミド(2つの特異的プライマー(Emi, M., Nakamura et al., Gene, 41, 305-310, 1986)を用いて実施例3(2)工程5で得られたcDNAライブラリーより増幅し、pCR IIベクターにサブクローニングして得た)をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。

【0060】同様に、SP59遺伝子の成熟タンパク質をコードする遺伝子の5'上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーKY241、およびKY207を設計した。KY241およびKY207は、配列番号:11および12に示した。これらプライマーKY241およびKY207を用い、pSPORT / SP59-#3プラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu 11021)で消化後、DNA断片を単離・精製した。次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とSP59遺伝子の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(EcoRIおよびBpu 11021)で前消化したpdkCR/SP59ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させた。形質転換したコロニーのうち目的のキメラ遺伝子を含むコロニーをPCR法により確認し、目的とするキメラ遺伝子(Trp59)の発現プラスミド(pdkCR/Trp59)を得た。

【0061】(2)COS-1細胞における発現
実施例5(1)で作製したキメラ遺伝子(Trp59)の発現プラスミドを用いて、動物細胞での発現を試みた。発現用動物細胞としてCOS-1細胞を用い、リポフェクティン法により発現プラスミドとしてpdkCR/Trp59及びpdkCRをそれぞれトランスフェクションした。すなわち、直径1.0cmの培養用ディッシュ(Corning, 430167)にCOS-1細胞を1×10⁶細胞を植え込んだ。培地としては、10%

ウシ胎児血清を含むDulbecco's minimum essential medium (DMEM, 日水製薬)を用いた。

【0062】翌日、Opti-MEM培地(Life Technologies) 5mlで細胞をリンスした後、さらに、5mlのOpti-MEM培地を加え、37℃で2時間培養した。培養後、ディッシュ1枚あたり上述のプラスミド1μgおよびリポフェクティン(ファルマシア)10μgの混液を加え、さらに、37℃で5時間培養した。培養後、Opti-MEM培地を5ml加え、合計10mlとし、37℃で72時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。

【0063】(3)酵素活性の測定

実施例5(2)で得られた細胞培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、COS-1細胞の培養上清50μlにエンテロキナーゼ(1mg/ml, Biozyme Laboratories)10μlを混和し、室温で15分間反応させた。次に、DMSOに溶解した合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCA(ペプチド研究所)を0.1M Tris/HCl, pH8.0で希釈した0.2M基質溶液を50μl加え、さらに、室温で60分間反応させた。反応後、励起波長485nm、蛍光波長535nmにおける蛍光を測定した。

【0064】その結果、図2に示したように、Trp59遺伝子を発現したCOS-1細胞の培養上清にエンテロキナーゼを加えることにより酵素活性を認めた。この結果、SP59遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質は、酵素活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなったばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。

【0065】

【発明の効果】本発明者らは、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞から新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離し、かつ単離した遺伝子が成熟タンパク質としてセリンプロテアーゼ酵素活性を持っていることを明らかにした。また、今回初めて得られた新規セリンプロテアーゼ遺伝子が結腸癌由来にもかかわらず、SP59遺伝子は、ヒト脳に強く発現していることが明らかとなった。

【0066】このように、癌細胞を用いたセリンプロテアーゼ遺伝子の単離は、新規遺伝子のリソースとして有用であることが明白である。さらに、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離したとしても、あるいは、単離した遺伝子を用いてmRNAの発現を検討したとしても、翻訳されたタンパク質が、その臓器局所で機能的に発現しているかどうかは、保証の限りではない。

【0067】今回、前述した方法で新規セリンプロテアーゼ遺伝子を発現させ、機能的なタンパク質をコードすることを明らかにしたことは、当該遺伝子の有用性を証明するものである。また、当該遺伝子を用いて発現したタンパク質が、機能的なタンパク質であることから、本

酵素特異的阻害剤のスクリーニング系を確立することにより、各種疾患治療剤をスクリーニングすることが、初めて可能となる。

【0068】

【配列表】

配列番号：1

配列

GTGCTCACNG CNGCBAYTG

20

【0069】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AGCGGNCCNC CDGARTCVCC

20

【0070】配列番号：3

配列の長さ：1438

配列の型：核酸

配列

GGACACACGC TGTAGCTGTC TCCCGGGCTG GCTGGCTCGC TCTCTCTGG GGACACAGAG 60
GTCGGCAGGC AGCACACAGA GGGACCTACG GGCAGCTGTT CCTTCCCCG ACTCAAGAAT 120

【0071】

CCCCGAGGC CCGGAGGCCT GCAGCAGGAG CGGCC ATG AAG AAG CTG ATG GTG 173
Met Lys Lys Leu Met Val

-20

GTG CTG AGT CTG ATT GCT GCA GCC TGG GCA GAG GAG CAG AAT AAG TTG 221
Val Leu Ser Leu Ile Ala Ala Ala Trp Ala Glu Glu Gln Asn Lys Leu
-15 -10 -5 -1 1

GTG CAT GGC GGA CCC TGC GAC AAG ACA TCT CAC CCC TAC CAA GCT GCC 269
Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser His Pro Tyr Gln Ala Ala
5 10 15

CTC TAC ACC TCG GGC CAC TTG CTC TGT GGT GGG GTC CTT ATC CAT CCA 317
Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Ile His Pro
20 25 30

CTG TGG GTC CTC ACA GCT GCC CAC TGC AAA AAA CCG AAT CTT CAG GTC 365
Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Asn Leu Gln Val
35 40 45

TTC CTG GGG AAG CAT AAC CTT CGG CAA AGG GAG AGT TCC CAG GAG CAG 413
Phe Leu Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gln
50 55 60 65

AGT TCT GTT GTC CGG GCT GTG ATC CAC CCT GAC TAT GAT GCC GCC AGC 461
Ser Ser Val Val Arg Ala Val Ile His Pro Asp Tyr Asp Ala Ala Ser
70 75 80

CAT GAC CAG GAC ATC ATG CTG TTG CGC CTG GCA CGC CCA GCC AAA CTC 509
His Asp Gln Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu Ala Arg Pro Ala Lys Leu
85 90 95

TCT GAA CTC ATC CAG CCC CTT CCC CTG GAG AGG GAC TGC TCA GCC AAC 557
Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys Ser Ala Asn
100 105 110

【0072】

ACC ACC AGC TGC CAC ATC CTG GGC TGG GGC AAG ACA GCA GAT GGT GAT 605
Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly Lys Thr Ala Asp Gly Asp

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA t o mRNA

```

      115              120              125
TTC CCT GAC ACC ATC CAG TGT GCA TAC ATC CAC CTG GTG TCC CGT GAG   653
Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile His Leu Val Ser Arg Glu
      130              135              140              145
GAG TGT GAG CAT GCC TAC CCT GGC CAG ATC ACC CAG AAC ATG TTG TGT   701
Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gln Asn Met Leu Cys
      150              155              160
GCT GGG GAT GAG AAG TAC GGG AAG GAT TCC TGC CAG GGT GAT TCT GGG   749
Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
      165              170              175
GGT CCG CTG GTA TGT GGA GAC CAC CTC CGA GGC CTT GTG TCA TGG GGT   797
Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg Gly Leu Val Ser Trp Gly
      180              185              190
AAC ATC CCC TGT GGA TCA AAG GAG AAG CCA GGA GTC TAC ACC AAC GTC   845
Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asn Val
      195              200              205
TGC AGA TAC ACG AAC TGG ATC CAA AAA ACC ATT CAG GCC AAG   887
Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys
      210              215              220
TGACCCCTGAC ATGTGACATC TACCTCCCGA CCTACCACCC CACTGGCTGG TTCCAGAACG   947
TCTCTCACCT AGACCTTGCC TCCCCTCCTC TCCTGCCCAG CTCTGACCCT GATGCTTAAT 1007
AAACGCAGCG ACGTGAGGGT CCGTATTCTC CTGGTTTTC CCCCAGCTCC ATCCTTGCAT 1067
CACTGGGGAG GACGTGATGA GTGAGGACTT GGGTCCTCGG TCTTACCCCC ACCACTAAGA 1127
GAATACAGGA AAATCCCTTC TAGGCATCTC CTCTCCCAA CCCTCCACA CGTTTGATTT 1187
CTTCCTGCAG AGGCCAGGCC ACGTGTCTGG AATCCAGCT CCGCTGCTTA CTGTCGGTGT 1247
CCCCTTGGGA TGTACCTTTC TTCCTGCAG ATTTCTCACC TGTAAGATGA AGATAAGGAT 1307
GATACAGTCT CCATAAGGCA GTGGCTGTTG GAAAGATTTC AGGTTTCACA CCTATGACAT 1367
ACATGGAATA GCACCTGGGC CACCATGCAC TCAATAAAGA ATGAATTTTA TAAAAAATA 1427
AAAAAAAAA A   1438

```

【0073】配列番号：4

配列の長さ：699

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

GTG GTG GGT GGG GAG GAG GCC TCT GTG GAT TCT TGG CCT TGG CAG GTC   48
Val Val Gly Gly Glu Glu Ala Ser Val Asp Ser Trp Pro Trp Gln Val
      1              5              10              15
AGC ATC CAG TAC GAC AAA CAG CAC GTC TGT GGA GGG AGC ATC CTG GAC   96
Ser Ile Gln Tyr Asp Lys Gln His Val Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp
      20              25              30
CCC CAC TGG GTC CTC ACG GCA GCC CAC TGC TTC AGG AAA CAT ACC GAT   144
Pro His Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Lys His Thr Asp
      35              40              45
GTG TTC AAC TGG AAG GTG CGG GCA GGC TCA GAC AAA CTG GGC AGC TTC   192
Val Phe Asn Trp Lys Val Arg Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gly Ser Phe
      50              55              60
CCA TCC CTG GCT GTG GCC AAG ATC ATC ATC ATT GAA TTC AAC CCC ATG   240
Pro Ser Leu Ala Val Ala Lys Ile Ile Ile Ile Glu Phe Asn Pro Met
      65              70              75              80
TAC CCC AAA GAC AAT GAC ATC GCC CTC ATG AAG CTG CAG TTC CCA CTC   288
Tyr Pro Lys Asp Asn Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln Phe Pro Leu

```

【0074】

	85	90	95	
ACT TTC TCA GGC ACA GTC AGG CCC ATC TGT CTG CCC TTC TTT GAT GAG				336
Thr Phe Ser Gly Thr Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Phe Phe Asp Glu				
100	105	110		
GAG CTC ACT CCA GCC ACC CCA CTC TGG ATC ATT GGA TGG GGC TTT ACG				384
Glu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Leu Trp Ile Ile Gly Trp Gly Phe Thr				
115	120	125		
AAG CAG AAT GGA GGG AAG ATG TCT GAC ATA CTG CTG CAG GCG TCA GTC				432
Lys Gln Asn Gly Gly Lys Met Ser Asp Ile Leu Leu Gln Ala Ser Val				
130	135	140		
CAG GTC ATT GAC AGC ACA CGG TGC AAT GCA GAC GAT GCG TAC CAG GGG				480
Gln Val Ile Asp Ser Thr Arg Cys Asn Ala Asp Asp Ala Tyr Gln Gly				
145	150	155	160	
GAA GTC ACC GAG AAG ATG ATG TGT GCA GGC ATC CCG GAA GGG GGT GTG				528
Glu Val Thr Glu Lys Met Met Cys Ala Gly Ile Pro Glu Gly Gly Val				
165	170	175		
GAC ACC TGC CAG GGT GAC AGT GGT GGG CCC CTG ATG TAC CAA TCT GAC				576
Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp				
180	185	190		
CAG TGG CAT GTG GTG GGC ATC GTT AGC TGG GGC TAT GGC TGC GGG GGC				624
Gln Trp His Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly				
195	200	205		
COG AGC ACC CCA GGA GTA TAC ACC AAG GTC TCA GCC TAT CTC AAC TGG				672
Pro Ser Thr Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp				
210	215	220		
ATC TAC AAT GTC TGG AAG GCT GAG CTG				699
Ile Tyr Asn Val Trp Lys Ala Glu Leu				
225	230			

【0075】配列番号：5

配列の長さ：723

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GTT	GTT	GGG	GGC	ACG	GAT	GCG	GAT	GAG	GGC	GAG	TGG	CCC	TGG	CAG	GTA	48
Val	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Ala	Asp	Glu	Gly	Glu	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	
1				5				10						15		
AGC	CTG	CAT	GCT	CTG	GGC	CAG	GGC	CAC	ATC	TGC	GGT	GCT	TCC	CTC	ATC	96
Ser	Leu	His	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	His	Ile	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	
			20					25						30		
TCT	CCC	AAC	TGG	CTG	GTC	TCT	GCC	GCA	CAC	TGC	TAC	ATC	GAT	GAC	AGA	144
Ser	Pro	Asn	Trp	Leu	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Tyr	Ile	Asp	Asp	Arg	
			35					40						45		
GGA	TTC	AGG	TAC	TCA	GAC	CCC	ACG	CAG	TGG	ACG	GTC	TTC	CTG	GGC	TTG	192
Gly	Phe	Arg	Tyr	Ser	Asp	Pro	Thr	Gln	Trp	Thr	Val	Phe	Leu	Gly	Leu	
			50					55						60		
CAC	GAC	CAG	AGC	CAG	CGC	AGC	GCC	CCT	GGG	GTG	CAG	GAG	CGC	AGG	CTC	240
His	Asp	Gln	Ser	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Glu	Arg	Arg	Leu	
65					70					75				80		
AAG	CGC	ATC	ATC	TCC	CAC	CCC	TTC	TTC	AAT	GAC	TTC	ACC	TTC	GAC	TAT	288
Lys	Arg	Ile	Ile	Ser	His	Pro	Phe	Phe	Asn	Asp	Phe	Thr	Phe	Asp	Tyr	

	85	90	95	
	GAC ATC GCG CTG CTG GAG CTG GAG AAA CCG GCA GAG TAC AGC TCC ATG	336		
	Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met			
	100	105	110	
【0076】				
	GTG GGG CCC ATC TGC CTG CCG GAC GCC TCC CAT GTC TTC CCT GCC GGC	384		
	Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly			
	115	120	125	
	AAG GCC ATC TGG GTC ACG GGC TGG GGA CAC ACC CAG TAT GGA GGC ACT	432		
	Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr			
	130	135	140	
	GGC GCG CTG ATC CTG CAA AAG GGT GAG ATC CGC GTC ATC AAC CAG ACC	480		
	Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr			
	145	150	155	160
	ACC TGC GAG AAC CTC CTG CCG CAG CAG ATC ACG CCG CGC ATG ATG TGC	528		
	Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys			
	165	170	175	
	GTG GGC TTC CTC AGC GGC GGC GTG GAC TCC TGC CAG GGT GAT TCC GGG	576		
	Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly			
	180	185	190	
	GGA CCC CTG TCC AGC GTG GAG GCG GAT GGG CGG ATC TTC CAG GCC GGT	624		
	Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly			
	195	200	205	
	GTG GTG AGC TGG GGA GAC GGC TGC GCT CAG AGG AAC AAG CCA GGC GTG	672		
	Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val			
	210	215	220	
	TAC ACA AGG CTC CCT CTG TTT CGG GAC TGG ATC AAA GAG AAC ACT GGG	720		
	Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly			
	225	230	235	240
	GTA			723
	Val			

【0077】配列番号：6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：13

配列の種類：

配列の型：アミノ酸

配列

Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gln Ser Ser Cys

1

5

10

【0078】配列番号：7

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：15

配列の種類：

配列の型：アミノ酸

配列

Lys Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys

1

5

10

15

【0079】配列番号：8

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：14

配列の種類：

配列の型：アミノ酸

配列

Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys

1

5

10

【0080】配列番号：9

配列の長さ 26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CACAGAATTC CACCATGAAT CTACTT

【0081】配列番号：10

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

TAGCACCTGC CGATCTTGTC ATCATCA

【0082】配列番号：11

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

GCAGACCTGC AGAACAAGTT GGTGCATG

【0083】配列番号：12

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列

AAAACCAGGG AGAATCAG

【図面の簡単な説明】

【図1】 Northern Blotting によるSP59遺伝子の各種ヒト臓器での発現をみた結果を示すニトロセルロース膜の図面に代わる写真である。PBL:peripheral blood lymphocyte(末梢リンパ球)

【図2】 COS-1 細胞で発現したSP59遺伝子のコードする

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

28

鎖の数：一本鎖

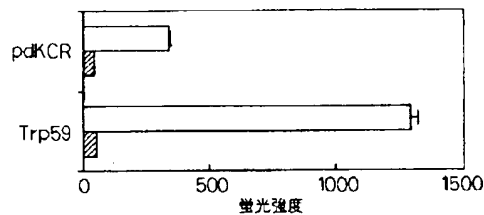
トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

18

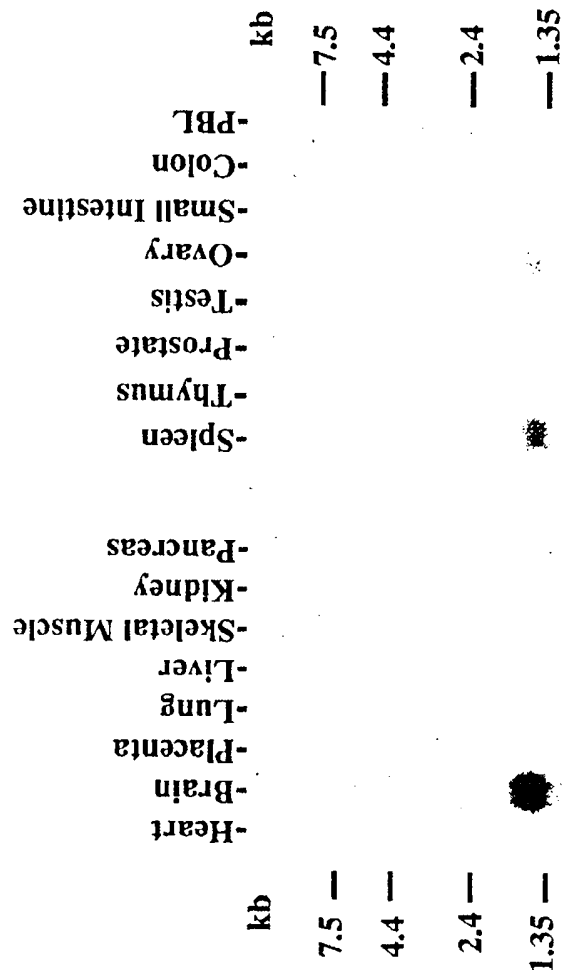
成熟タンパク質の酵素活性を検討した結果を示す図である。エンテロキナーゼを加えた場合を白のカラムで、また、エンテロキナーゼを加えない場合を斜線のカラムで示した。なお、pdKCR は使用した発現用ベクターのみをトランスフェクションしたCOS-1 細胞の培養上清を示す。

【図2】



【図1】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 N 9/52

// A 6 1 K 38/46

(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 5/00

A 6 1 K 37/54

技術表示箇所

B

Z N A

(C 1 2 N 9/52
C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 山口 希
京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新
御霊口町285-79